



技术主题
Technology Feature

Bt 水稻 T1C-19 中外源基因的三引物多重 PCR 检测方法

查中萍[✉], 万丙良[✉], 杜雪树[✉]

湖北省农业科学院粮食作物研究所, 湖北省粮食作物种质资源创新与遗传育种重点实验室, 武汉, 430064

✉ 通讯作者: ricewanbl@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 16 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0016

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

查中萍等, 2013, Bt 水稻 T1C-19 中外源基因的三引物多重 PCR 检测方法, 分子植物育种 (online), 11(16): 1106-1113 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0016)

引用格式(英文):

Zha et al., 2013, A Tri-primer Multiplex PCR Method for the Exogenous Genes in Bt Rice T1C-19, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(16): 1106-1113 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0016)

摘要 转 *cry1C* 基因水稻 T1C-19 是一个优良的抗螟虫水稻育种资源。本研究目的在于研发一种用于检测 T1C-19 及其衍生材料中外源基因的三引物多重 PCR (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。根据 T1C-19 中插入的外源基因序列和插入位点左右旁侧水稻基因组序列设计了 3 个 PCR 引物 C1、C2 和 C3, 并对多重 PCR 体系进行了优化。结果表明, 0.5 μL 10 μmol/L C1+0.4 μL 10 μmol/L C2+0.2 μL 10 μmol/L C3 的多重 PCR 体系可以准确区分 *cry1C* 基因纯合、杂合和阴性三种基因型, 纯合体和阴性材料中均只扩增出一条 DNA 片段, 纯合体中的片段大小为 512 bp, 而阴性材料中的片段大小为 386 bp, 杂合体中则同时扩增出这两条片段。该体系的建立为利用 T1C-19 进行抗螟虫水稻育种提供了一个简便有效的基因鉴定技术。

关键词 转基因水稻; 多重 PCR; 共显性标记; *cry1C*; T1C-19

A Tri-primer Multiplex PCR Method for the Exogenous Genes in Bt Rice T1C-19

Zha Zhongping[✉], Wan Bingliang[✉], Du Xueshu[✉]

Food Crop Research Institute, Hubei Academy of Agricultural Science, Hubei Key Laboratory of Crop Germplasm and Genetic Improvement, Wuhan, 430064, P.R. China

✉ Corresponding author, ricewanbl@126.com; ✉ Authors

Abstract T1C-19 is a transgenic rice possessing *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticide crystal protein encoding gene *cry1C*, which has a good resistance to leaf folder and stem borer, and can be used as an elite germplasm in the breeding of insect-resistant rice. The genotype identification of *cry1C* could greatly improve the breeding efficiency. This research aimed at developing a tri-primer multiplex PCR method to identify the genotype of *cry1C* in T1C-19 and its relative lines. Three primers of C1, C2 and C3 were designed according to the genomic sequence T1C-19. C2 was located on the T-DNA sequence where *cry1C* was located, and C1 and C3 were located on two flanking rice genomes of the T-DNA, respectively. The quantity of primers in multiplex PCR system was optimized. The result indicated that the tri-primer multiplex PCR system with 0.5 μL 10 μmol/L C1+0.4 μL 10 μmol/L C2+0.2 μL 10 μmol/L C3 could correctly identify three genotypes of *cry1C*. Only one DNA band was amplified in the homozygote and the negative, the DNA band was 512bp in the homozygote, but 386bp in the negative. The heterozygote had both two DNA bands above. A few varieties and two breeding populations from T1C-19 were used to verify the accuracy of the tri-primer multiplex PCR system, the result confirmed that the tri-primer multiplex PCR system could provide a convenient and effective method for the identification of *cry1C* gene in the breeding of insect-resistant rice with T1C-19 as a parent.

Keywords Transgenic rice; Multiplex PCR; Co-dominant marker; *cry1C*; T1C-19

收稿日期: 2013 年 03 月 20 日

接受日期: 2013 年 04 月 27 日

发表日期: 2013 年 06 月 08 日

基金项目: 本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08001-001) 及湖北省农业科技创新中心资助项目 (2007-620-001-03) 共同资助

研究背景

稻纵卷叶螟、二化螟和三化螟是水稻的主要害虫, 其危害会造成叶片枯白、枯心苗、白穗, 瘪谷大量增加, 严重影响水稻产量。转 Bt 毒蛋白基因水稻对稻纵卷叶螟、二化螟和三化螟具有良好的抗



性, 种植 Bt 水稻既可以有效避免稻纵卷叶螟、二化螟和三化螟对水稻的危害, 又可以减少杀虫剂的使用, 减轻环境污染。水稻科学家们已经培育出一系列的转 Bt 基因水稻如转 *cry1A(b)/cry1A(c)* 融合基因水稻 T51-1、T9-3, 转 *cry2A* 基因水稻 T2A-1, 转 *cry1C* 基因水稻 T1C-19 等(Tu et al., 2000; Ye et al., 2001a; Chen et al., 2005; Tang et al., 2006), 这些 Bt 水稻为培育抗螟虫水稻新品种提供了种质资源。在抗虫转基因水稻育种研究中, 以 Bt 水稻作抗虫基因供体, 优良常规水稻品种(品系)作受体进行杂交(回交)选育, 再利用分子标记对抗虫基因进行跟踪, 从而选育出抗螟虫的优良水稻新品种(品系)。外源 Bt 基因是否纯合是影响育种进程的一个关键因素。目前所用的检测 Bt 基因的分子标记主要是根据导入的外源基因片段序列设计的特异显性标记, 该标记只能检测目标基因的有无, 不能区分杂合基因型和纯合基因型, 需要在下一代对基因型进行验证, 因此显性标记检测效率低, 耗费时力(邓鸿铃等, 2007; Tang et al., 2006; Yang et al., 2011)。根据外源基因及其插入位点侧翼序列设计多重 PCR 标记可以有效的鉴别杂合基因型和纯合基因型, 提高选择效率, 加快育种进程(欧阳波等, 2006; 贾芝琪等, 2009; 张焕春等, 2012)。

转 *cry1C* 基因水稻新品系 T1C-19, 无论是人工接虫还是田间鉴定, 基本不受稻纵卷叶螟、二化螟和三化螟危害, 是培育抗螟虫水稻新品种(品系)的优良亲本(Tang et al., 2006; Zheng et al., 2011)。本研究根据 T1C-19 中插入的外源基因左侧水稻基因组序列设计 1 个正向引物 C1, 根据插入位点右侧水稻基因组序列设计 1 个反向引物 C3, 在插入的外源基因序列靠近左侧水稻基因组处设计 1 个反向引物 C2。利用这 3 个引物进行多重 PCR 扩增, 在非转基因水稻和纯合转基因水稻中分别扩增出大小不同的 1 个片段, 在转基因杂合体中同时扩增出上述 2 个片段。因此该体系可以同时鉴定出转基因纯合、转基因杂合和转基因阴性 3 种基因型, 为利用 T1C-19 进行抗螟虫水稻分子育种提供了一个简便有效的基因鉴定技术。

1 结果与分析

1.1 内参基因的检测

利用内参 *actin* 基因引物对转基因水稻 T1C-19, 非转基因水稻 9311、R838、宜恢 72, 杂交 F₁ 代材料 9311/T1C-19、R838/T1C-19、宜恢

72/T1C-19 进行 PCR 检测, 结果见图 1。除了空白对照外的所有水稻材料中均扩增出 303 bp 目标片段。说明所用 DNA 模板和 PCR 扩增体系正常。

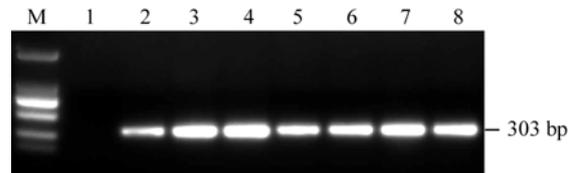


图 1 内参基因 *actin* 的 PCR 检测结果

注: M: DL2000 marker; 1: H₂O; 2: T1C-19; 3: 9311/ T1C-19; 4: R838/ T1C-19; 5: 宜恢 72/T1C-19; 6: 9311; 7: R838; 8: 宜恢 72
Figure 1 PCR result of the reference gene *actin*

Note: M: DL2000 marker; 1: H₂O; 2: T1C-19; 3: 9311/ T1C-19; 4: R838/ T1C-19; 5: Yihui72/T1C-19; 6: 9311; 7: R838; 8: Yihui72

1.2 二引物 PCR 体系对转基因水稻材料扩增的特异性

以不同类型水稻材料 DNA 为模板, 分别利用引物 C1+C2 和 C1+C3 进行 PCR 扩增, 结果见图 2。C1+C2 在转基因纯系 T1C-19、转基因杂合体 9311/T1C-19、R838/T1C-19、宜恢 72/T1C-19 中扩增出一条约 512 bp 的片段, 在非转基因材料 9311、R838、宜恢 72 中没有扩增产物(图 2A)。C1+C3 在转基因纯系 T1C-19 中没有产物, 在转基因杂合体 9311/T1C-19、R838/ T1C-19、宜恢 72/T1C-19, 以及非转基因材料 9311、R838、宜恢 72 中扩增出一条约 386 bp 的片段(图 2B)。该结果与设计的扩增产物大小一致。

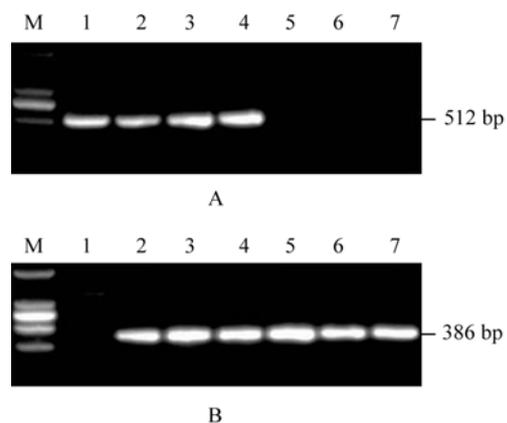


图 2 二引物 PCR 体系在水稻材料中的扩增

注: M: DL2000 marker; 1: T1C-19; 2: 9311/ T1C-19; 3: R838/ T1C-19; 4: 宜恢 72/ T1C-19; 5: 9311; 6: R838; 7: 宜恢 72; A: C1+C2 引物扩增结果; B: C1+C3 引物扩增结果

Figure 2 PCR amplification with two-primer system in rice

Note: M: DL2000 marker; 1: T1C-19; 2: 9311/ T1C-19; 3: R838/ T1C-19; 4: Yihui72/ T1C-19; 5: 9311; 6: R838; 7: Yihui72; A: PCR of C1+C2 primers; B: PCR of C1+C3 primers

1.3 二引物体系扩增产物的序列分析

为了进一步验证二引物体系扩增产物是否为目标基因序列,对引物 C1+C2 和 C1+C3 在 9311、TIC-19 和 9311/TIC-19 中扩增出的片段进行测序(图 3)。C1+C2 在 TIC-19 和 9311/TIC-19 中扩增出的 DNA 片段序列完全一致(图 3a)。对该序列进行 BLAST 分析,结果表明该序列与引物设计时所用的 GeneBank (HQ161062.1)中的 TIC-19 的基因组序列相同,其中小写部分为 T-DNA 插入位点的侧翼序

列,大写部分为 T-DNA 序列。C1+C3 在 9311 和 9311/ TIC-19 中扩增出的 DNA 片段序列也完全一致(图 3b)。BLAST 分析表明,该片段来自于水稻第 11 染色体组(GeneBank: AC123519.2),且与 TIC-19 的 T-DNA 插入位点的侧翼序列相同,其中大写部分为 T-DNA 插入位点的左侧翼序列,小写部分为 T-DNA 插入位点的右侧翼序列。测序结果表明,引物 C1+C2 和 C1+C3 的扩增结果与设计一致,均扩增出目标片段。



图 3 二引物 PCR 体系扩增产物序列分析

注: a: C1+C2 在 TIC-19 和 9311/ TIC-19 中扩增出的 DNA 片段序列,小写部分为 T-DNA 插入位点的左侧翼水稻基因组序列,大写部分为 T-DNA 序列,横线部分分别为引物 C1 和 C2 位置; b: C1+C3 在 9311 和 9311/ TIC-19 中扩增出的水稻基因组序列片段,大写部分和小写部分的交界处为 TIC-19 基因组中外源 T-DNA 的插入位点,横线部分分别为引物 C1 和 C3 位置

Figure 3 The sequence of PCR products with two-primer system

Note: a: The sequence of PCR product with C1+C2 PCR system in TIC-19 and 9311/ TIC-19, Lowercase part is the left flanking rice genomic sequence of T-DNA, uppercase part is the T-DNA sequence, the underlines indicate the positions of the primer C1 and C2, respectively; b: The rice genomic sequence of PCR product with C1+C3 PCR system in 9311 and 9311 / TIC-19, the junction of uppercase part and lowercase part is the insertion site of T-DNA in TIC-19 genome, the underlines indicate the positions of the primer C1 and C3, respectively

1.4 三引物多重 PCR 扩增体系的优化

本研究中两个目标片段的引物退火温度设计相同,因此在二引物扩增的基础上,按照原有 DNA 模板浓度、dNTP、DNA 聚合酶用量,而引物 C1、C2、C3 按 2:1:1 用量配置三引物 PCR 扩增体系。结果发现两个片段有不对称扩增现象。在此基础上

改变 DNA 模板浓度及扩增循环数,发现两个目标片段的不对称扩增现象仍然存在。结合三引物多重 PCR 扩增体系中存在 1 个正向引物 C1 和 2 个反向引物 C2、C3,引物之间的竞争会影响扩增效果。为此,设计了 4 个不同引物使用量的 PCR 反应体系。体系 1: 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L



C2+0.4 μ L 10 μ mol/L C3, 体系 2: 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.3 μ L 10 μ mol/L C3, 体系 3: 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.2 μ L 10 μ mol/L C3, 体系 4: 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.1 μ L 10 μ mol/L C3。并利用转基因纯系 T1C-19、转基因杂合体 9311/T1C-19 和非转基因材料 9311 基因组 DNA 为模板, 进行三引物 PCR 扩增。由图 4 看出, 4 个 PCR 反应体系均能区分转基因杂合体、转基因纯合体和转基因材料, T1C-19、9311 及杂合体 9311/T1C-19 中扩增出清晰的片段, 片段大小分别与 T1C-19 和 9311 中的片段大小一致。体系 3 的扩增效果最好, 表现在杂合体两条片段的扩增量几乎一致。

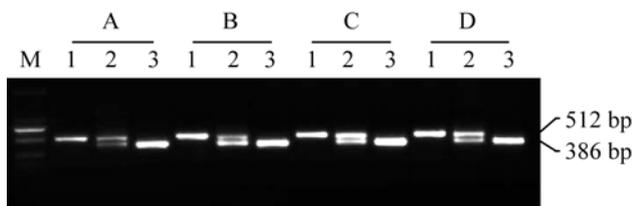


图 4 三引物多重 PCR 反应体系中不同引物使用量的扩增效果
注: M: DL2000 marker; 1~3: T1C-19, 9311/T1C-19, 9311;
A: 体系 1, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.4 μ L 10 μ mol/L C3; B: 体系 2, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.3 μ L 10 μ mol/L C3; C: 体系 3, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.2 μ L 10 μ mol/L C3; D: 体系 4, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.1 μ L 10 μ mol/L C3
Figure 4 The effects of primer quantities on tri-primer multiplex PCR amplification

Note: M: DL2000 marker, 1~3: T1C-19, 9311/T1C-19, 9311; A: System 1, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.4 μ L 10 μ mol/L C3; B: System 2, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.3 μ L 10 μ mol/L C3; C: System 3, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.2 μ L 10 μ mol/L C3; D: System 4, 0.5 μ L 10 μ mol/L C1+0.4 μ L 10 μ mol/L C2+0.1 μ L 10 μ mol/L C3

1.5 三引物多重 PCR 扩增体系在转基因后代材料中的验证

利用优化后的三引物多重 PCR 扩增体系 3 对 T1C-19, 非转基因水稻 R838、宜恢 72 及其杂种 R838/T1C-19 和宜恢 72/T1C-19 进行检测, 结果见图 5。在 T1C-19 中扩增出一条 512 bp 的片段, 在 R838、宜恢 72 中分别扩增出一条 386 bp 片段, 在 R838/T1C-19 和宜恢 72/T1C-19 中同时扩增出 512 bp 和 386 bp 的两条片段。检测结果表明, 在这些材料中该体系同样可以准确地区分转基因杂合体、转基因纯合体和转基因材料。

在 9311/T1C-19、R838/T1C-19 和宜恢 72/T1C-19 的 F₂ 代植株中分别随机取 10 株, 利用 PCR 扩增体系 3 进行检测, 检测结果显示, 在 F₂ 代中出现了转基因杂合、转基因纯合和转基因阴性单株的分离(表 1)。收获这 10 株的种子种植成 F₃ 代株系, 每个株系取 20 株进行三引物 PCR 检测。检测结果表明, 来自 F₂ 代转基因纯合和转基因阴性单株的 F₃ 家系目标基因稳定, 仍为转基因纯合和转基因阴性基因型, 而来自 F₂ 代转基因杂合单株的 F₃ 家系中目标基因发生分离, 出现转基因杂合、转基因纯合和转基因阴性单株。以上结果表明, 利用该三引物多重 PCR 扩增体系可以准确地鉴定出 T1C-19 及其衍生的后代材料中转基因杂合、转基因纯合和转基因阴性植株。

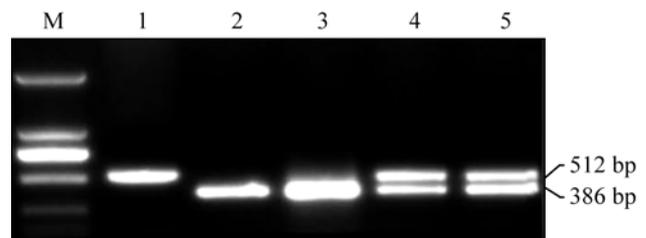


图 5 三引物多重 PCR 扩增体系在不同水稻材料中的验证
注: M: DL2000 marker; 1: T1C-19; 2: R838; 3: 宜恢 72; 4: R838/T1C-19; 5: 宜恢 72/T1C-19

Figure 5 The tri-primer multiplex PCR amplification in various rice varieties (combinations)

Note: M: DL2000 marker; 1: T1C-19; 2: R838; 3: Yihui72; 4: R838/T1C-19; 5: Yihui72/T1C-19

2 讨论

目前, 将 Bt 基因导入到水稻中并获得良好抗性的水稻品种越来越多(Chen et al., 2005; Ye et al., 2001b), 导入 *cry1C* 基因的 T1C-19 是抗螟虫表现最好的转基因材料之一(Tang et al., 2006), 随着抗虫转基因技术的广泛应用和日趋成熟, 利用 T1C-19 作为抗虫基因供体, 已经培育了多个抗虫水稻新品系(田雨等, 2011; 冯睿彤等, 2012)。目前对 T1C-19 的杂交后代 *cry1C* 基因检测的分子标记均属于显性标记(Tang et al., 2006; Yang et al., 2011; 田雨等, 2011; 李孝琼等, 2012), 这些标记只能判断外源基因的有无, 但无法区别基因型是纯合还是杂合。本研究建立了用于检测转基因水稻 T1C-19 及其衍生材料中外源基因的三引物多重 PCR 检测体系, 该体系可以准确简便地区分出转基因杂合、转基因纯合和转基因阴性三种基因型。

表 1 转基因水稻 F₂ 代和 F₃ 代材料的三引物多重 PCR 检测结果Table 1 The results of tri-primer multiplex PCR in F₂ and F₃ breeding populations

| F ₁ 代组合 F ₁ hybrid combinations | F ₂ 代 PCR 检测株数 The plant number detected with PCR in F ₂ population | F ₂ 不同基因型植株数 The genotype and plant number of F ₂ population | F ₃ 家系基因型 The genotypes of F ₃ lines |
|--|---|--|---|
| 9311/T1C-19 | 10 | RR 2 | RR |
| | | Rr 5 | RR、Rr、rr |
| | | rr 3 | rr |
| R838/T1C-19 | 10 | RR 2 | RR |
| | | Rr 6 | RR、Rr、rr |
| | | rr 2 | rr |
| 宣恢 72/T1C-19 | 10 | RR 1 | RR |
| Yihui72/ T1C-19 | | Rr 6 | RR、Rr、rr |
| | | rr 3 | rr |

注: RR: 基因纯合; Rr: 基因杂合; rr: 阴性

Note: RR: The homozygous; Rr: The heterozygous; rr: The negative

多重 PCR 技术利用一次 PCR 反应检测多个靶标 DNA 片段, 比传统 PCR 省时省力。该技术已广泛地应用于转基因植物的检测, 主要是用于同时检测多个外源基因成分的存在(吴影等, 2006; 武海斌等, 2009; 魏霜等, 2012), 也有利用外源基因插入的侧翼序列设计共显性引物标记进行多重 PCR 检测转基因的基因型(欧阳波等, 2006; 贾芝琪等, 2009; 张焕春等, 2012)。本研究针对 T1C-19 中特异转化事件, 设计了同时检测 2 个靶标片段的 3 个共显性引物标记 C1、C2 和 C3 (图 6) 及其三引物多重 PCR 体系。多重 PCR 技术的难点主要体现在反应体系的不平衡。反应体系的不平衡导致在前面几轮循环中优势引物的扩增产物大量增加, 而这些大量增加的产物又对 DNA 聚合酶起抑制作用(Santalucia, 2007), 从而使前期处于劣势的引物的扩增产物效率越来越低。引物设计的缺陷是导致反应体系的不平衡的主要原因, 包括引物退火温度不一致, 特异性差, 存在二聚体等(胡毅玲等, 2001; 黄银花等, 2003)。本文根据 2 个靶标片段所设计的引物退火温度相同, 都是 55℃, 引物经过 Blast 分析, 特异性强且不存在二聚体。利用这些引物分别进行单一 PCR 扩增都能特异地扩增出目标 DNA 片段。有大量研究表明, 在成功的单一 PCR 扩增条件下, 进行多重 PCR 反应, 一般都能得到较好的扩增结果(Arlorio et al., 2002; Ma et al., 2003; 王风格等, 2003)。本文设计的 3 个引物中, 其中 1 个引物为共用的上游引物。因此在建立多重 PCR 体系时先从反

应体系中的引物配比上着手, 其他反应体系如 DNA 模板浓度、dNTP、DNA 聚合酶用量保持与单一 PCR 一致, 这样既可以简化多重 PCR 反应体系, 又可以解决多重 PCR 中多个产物不对称扩增。本研究设计的三引物 PCR 扩增体系扩增产物条带清晰, 产物测序结果正确。用该体系对不同的转基因杂交组合及其亲本材料进行检测, 均能区分转基因杂合、转基因纯合和转基因阴性三种基因型。通过对 T1C-19 不同转基因杂交组合的分离世代 F₂ 代基因型检测及对 F₃ 家系基因型的进一步验证, 结果表明该体系对 T1C-19 不同转基因杂交后代的基因型鉴定准确率达到 100%, 说明该体系可以用于 T1C-19 及其衍生系中的 *cry1C* 基因型检测。

利用已有的 Bt 水稻资源进行抗螟虫水稻育种是防治水稻螟虫的有效途径, C1+C2+C3 三引物多重 PCR 检测方法的建立为利用 T1C-19 进行抗螟虫水稻分子育种提供了一个简便有效的基因鉴定技术, 有利于提高对 *cry1C* 基因的检测效率, 加快抗螟虫水稻育种进程。

3 材料与方法

3.1 水稻(*Oryza sativa* L.)材料和试剂

转 *cry1C* 基因纯合系 T1C-19 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家植物基因研究中心(武汉)提供。非转基因水稻 9311、辐恢 838、宣恢 72 由作者实验室保存。

以非转基因水稻 9311、辐恢 838、宣恢 72 为



母本, T1C-19 为父本进行杂交, 获得 *cry1C* 基因杂合的 F₁ 代, F₁ 代自交获得 F₂ 代, 在 F₂ 代中随机选择 10 株进行 3 引物 PCR 检测, 分别收获这 10 株自交种子种植成 F₃ 代株系。

DNA 提取和 PCR 检测试剂均购自 Takara 公司。

3.2 方法

3.2.1 DNA 提取

取约 1~2 cm 长的水稻幼嫩叶片置于 2 mL 圆底离心管中, 加入 2×CTAB 400 μL 后在 QIAGEN TissueLyser 样品研磨仪中磨碎匀浆, 置 60°C 水浴 20 min, 加入 400 μL 氯仿/异戊醇(24:1)震荡混匀 10 min, 10 000 rpm 离心 10 min, 取 200 μL 上清置于另一加有 400 μL 95% 预冷乙醇的 1.5 mL 离心管, 静置 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后晾干, 加入 50 μL 灭菌的超纯水溶解。

3.2.2 水稻内参基因的 PCR 检测

为了保证水稻基因组 DNA 的质量和 PCR 检测体系的正常可靠, 以水稻 *actin* 基因作为参照基因 (Liu et al., 2007)。*actin* 基因(RAc1, Accession number X16280)上下游引物分别为 5'-aagatcctgacggagcgtg-gttac-3' 和 5'-cttctaataatccacgtcgcacttc-3'。PCR 产物大小为 303 bp。PCR 反应体系为 15 μL, 其中包含 10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1.2 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.3 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应程序为 94°C 反应 4 min, 然后进入三温度循环, 每个循环包括 94°C 反应 40 s, 58°C 反应 30 s, 72°C 反应 30 s, 共 30 个循环, 最后 72°C 反应 5 min。

3.2.3 三引物设计

在 T1C-19 中 T-DNA 序列左侧水稻基因组序列 (GenBank: HQ161062.1) 中设计一条正向引物 C1, 序列为 5'-cacgaaagagaagggcactc-3'; 在 T-DNA 序列右侧水稻基因组序列中设计一条反向引物 C3, 序列为 5'-gcaactgtgtgtaggtatg-3'; 在 T-DNA 中靠近左侧水稻基因组处设计一条反向引物 C2, 序列为 5'-tcccagataaggaattaggg-3'。T-DNA 的插入位点和引物位置(图 6a), T-DNA 的侧翼序列(图 6b)。在非转基因水稻中, C1+C3 扩增出一条 386 bp 的 PCR 产物; 在转基因纯合体中 C1+C2 扩增出一条 512 bp 的 PCR 产物, 由于 T-DNA 序列过长, C1+C3 没有扩增产物。在转基因杂合体中同时扩增出 386 bp 和 512 bp 的 2 条带。引物利用 Premier 3 软件设计, 由

上海生工生物工程技术有限公司合成。

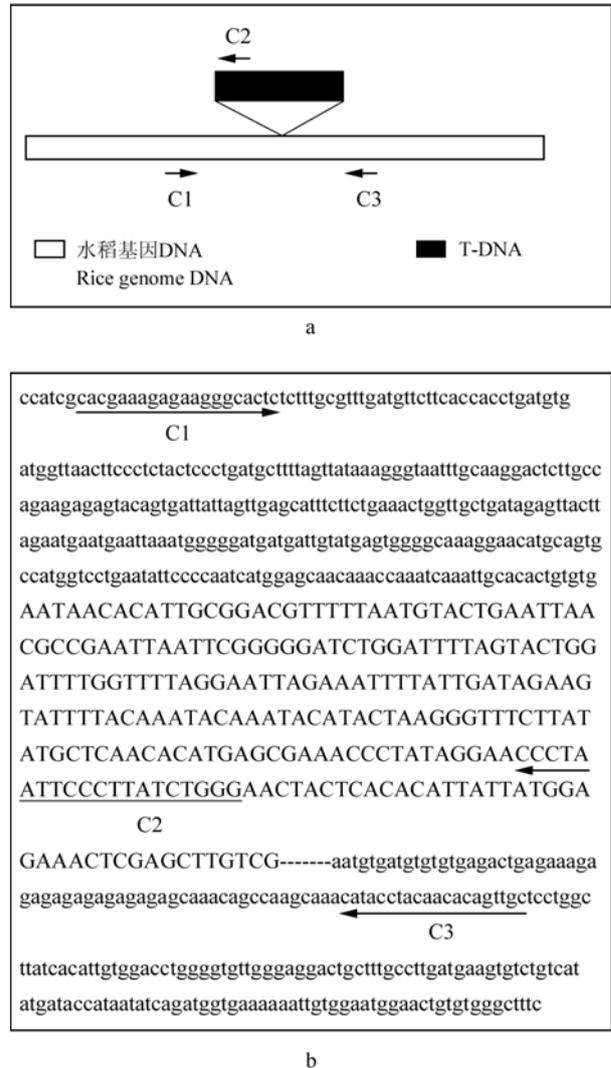


图 6 三引物在转基因水稻 T1C-19 基因组中的位置
注: a: 三引物 C1、C2 和 C3 在水稻基因组和 T-DNA 中的位置示意图, C1 在 T-DNA 插入位点的左侧水稻基因组序列中, 为正向引物, C3 在 T-DNA 插入位点的右侧水稻基因组序列中, 为反向引物, C2 在 T-DNA 中靠近左侧部分; b: T-DNA 部分序列及插入位点两端的序列; 中间大写部分为 T-DNA 序列, 左右两侧小写部分为插入位点两端水稻基因组序列, 箭头所示为三引物 C1、C2 和 C3 所在序列位置
Figure 6 The position of three primers in the genome of T1C-19
Note: a: The position of primer C1, C2 and C3 in rice genome and T-DNA sequence, C1 is a forward primer in the left flanking rice genomic sequence of T-DNA in T1C-19, C3 is a revert primer in the right flanking rice genomic sequence of T-DNA in T1C-19, C2 is a revert primer in the left part of T-DNA sequence; b: The partial sequence of T-DNA and the flanking rice genomic sequences of T-DNA; The middle uppercase part is the T-DNA sequence, the left and right lowercase part are the flanking rice genomic sequences of T-DNA, the arrows indicate the positions of primer C1, C2 and C3

3.2.4 二引物PCR扩增特异性检测

PCR 反应体系为 15 μL , 其中包含 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 1.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 1.2 μL , 5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL , DNA 模板 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 C1、C2(或者 C1, C3)使用量分别为 0.3 μL 。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 min, 然后进入三温度循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。

3.2.5 二引物 PCR 扩增产物测序

PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收包含目标片段的胶块, 用上海生工生物工程技术有限公司生产的 DNA 胶回收试剂盒回收目标片段 DNA, 送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

3.2.6 三引物多重 PCR 检测体系

PCR 反应体系为 15 μL , 其中包含 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 1.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 1.2 μL , 5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL , DNA 模板 1 μL 和适量的三引物 C1、C2、C3。C1、C2 和 C3 的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 引物使用量根据优化结果确定。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 min, 然后进入三温度循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。

作者贡献

查中萍、万丙良和杜雪树是本研究的实验设计和执行人; 查中萍参与实验设计、实验操作、数据分析和论文写作; 万丙良是项目的构思者和负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作和修改; 杜雪树参与实验操作和数据处理。

致谢

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08001-001)及湖北省农业科技创新中心资助项目(2007-620-001-03)共同资助。作者感谢华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家植物基因研究中心(武汉)林拥军教授提供的 Bt 水稻 TIC-19。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

Arlorio M., Coisson J., Cereti E., Travaglia F., Capasso M., and Martelli A., 2002, Polymerase chain reaction (PCR) of puoindoline b and ribosomal/puoindoline b multiplex PCR for the detection of common wheat (*Triticum aestivum*) in Italian pasta, European Food Research and

Technology, 216(3): 253-258

Chen H., Tang W., Xu C.G., Li X.H., Lin Y.J., and Zhang Q.F., 2005, Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests, Theor. Appl. Genet., 111: 1330-1337

<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-0062-8>

PMid:16187120

Deng H.L., Guo X.D., and Wu Y.L., 2007, Detection of BT transgenic rice gene by polymerase chain reaction, Xiandai Shipin Keji (Modern Food Science and Technology), 23(4): 71-74 (邓鸿铃, 郭新东, 吴玉璠, 2007, 利用 PCR 方法检测转 BT 基因水稻, 现代食品科技, 23(4): 71-74)

Feng R.T., Xu J.Y., Yan C.Y., Deng X.W., Li C.H., and Mou T.M., 2012, Improvement of insect resistance of rice restorer line zhenhui 084, Zajiao Shuidao (Hybrid Rice), 27(1): 60-66 (冯睿彤, 徐俊英, 闫成业, 邓学武, 李春海, 牟同敏, 2012, 水稻三系恢复系镇恢084的螟虫抗性改良, 杂交水稻, 27(1): 60-66)

Hu Y.L., Wang S.Y., Chi G.B., Guo C., and Liao Y.P., 2001, Multiplex PCR for detection of genetic marker on cancer in molecular epidemiological study, Zhongguo Gonggong Weisheng (China Public Health), 17(5): 412-413 (胡毅玲, 王声湧, 池桂波, 郭畅, 廖倚萍, 2001, 多重PCR 在肿瘤遗传标志分子流行病学研究中的应用, 中国公共卫生, 17(5): 412-413)

Huang Y.H., Hu X.X., Xu W.Z., Gao Y., Feng J.D., Sun H., and Li N., 2003, The factors affecting the efficiency of multiplex PCR, Yichuan (Hereditas (Beijing)), 25(1): 65-68 (黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 高宇, 冯继东, 孙汉, 李宁, 2003, 影响多重PCR扩增效果的因素, 遗传, 25(1): 65-68)

Jia Z.Q., Zhang Z.H., Cui Y.H., Li Y., Huang S.W., and Du Y.C., 2009, Creening homozygous transgenic plants by flanking sequences amplification of T-DNA in tomatoes, (Journal of Agricultural Biotechnology), 17(5): 820-824 (贾芝琪, 张忠华, 崔艳红, 李颖, 黄三文, 杜永臣, 2009, 利用外源基因侧翼序列扩增筛选番茄纯合转基因植株, 农业生物技术学报, 17(5): 820-824)

Li X.Q., Guo S.B., Wei Y., Li J.M., Liu K.Q., and Gao G.Q., 2012, Comparison of two screening methods for detecting insect resistant offspring of Bt-transgenic rice, Nanfang Nongye Xuebao (Journal of Southern Agriculture), 43(2): 141-145 (李孝琼, 郭嗣斌, 韦宇, 李杰民, 刘开强, 高国庆, 2012, Bt 抗虫水稻转育后代两种筛选方法的比较, 南方农业学报, 43(2): 141-145)

Liu J.G., Zhang Z., Qin Q.L., Peng R.H., Xiong A.S., Chen J.M., Xu F., Zhu H., and Yao Q.H., 2007, Isolated and characterization of a cDNA encoding ethylene-responsive element binding protein (EREBP)/AP2-type protein, RCBF2, in *Oryza sativa* L., Biotechnol. Lett., 29(1): 165-173

<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9214-4>

PMid:17136305



- Ma W., Zhang W., and Gale K.R., 2003, Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat, *Euphytica*, 134(1): 51-60
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1026191918704>
- Ou Y.B., Long F., Zhang Y.Y., and Ye Z.B., 2006, Rapid and large-scale genetic analysis of transgenic tomato by NPT II marker, *Wuhan zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research)*, 24(1): 12-16 (欧阳波, 龙芳, 张扬勇, 叶志彪, 2006, 利用转基因标记 NPT II 快速、规模化纯合转基因番茄, *武汉植物学研究*, 24(1): 12-16)
- SantaLucia J., 2007, Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design, *Methods in Molecular Biology*, 402: 3-34
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_1
PMid:17951788
- Tang W., Chen H., Xu C.G., Li X.H., Lin Y.J., and Zhang Q.F., 2006, Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cryIC** gene, *Molecular Breeding*, 18(1): 1-10
<http://dx.doi.org/10.1007/s11032-006-9002-9>
- Tian Y., Xu J.Y., Li C.H., Lin Y.J., and Mou T.M., 2011, Improvement of insect-resistance of 9311 and development of insect-resistant rice hybrids, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 44(4): 664-672 (田雨, 徐俊英, 李春海, 林拥军, 牟同敏, 2011, 水稻品种 9311 的螟虫抗性改良和抗螟虫杂交稻组合选育, *中国农业科学*, 44(4): 664-672)
- Tu J.M., Zhang G.A., Datta K., Xu C.G., He Y.Q., Zhang Q.F., Khush G.S., and Datta S.K., 2000, Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, *Nature Biotechnology*, 18: 1101-1104
<http://dx.doi.org/10.1038/80310>
PMid:11017051
- Wang F.G., Zhao J.R., She H.D., Guo J.L., Chen G., Liao Q., Sun S.X., and Chen R.M., 2003, Series of research on establishing DNA fingerprinting database of Chinese new maize cultivars III. Multiplex PCR applied in maize SSR amplification, *Yumi Kexue (Journal of Maize Sciences)*, 11(4): 3-6 (王凤格, 赵久然, 余花娣, 郭景伦, 陈刚, 廖琴, 孙世贤, 陈如明, 2003, 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 III. 多重 PCR 技术在玉米 SSR 引物扩增中的应用, *玉米科学*, 11(4): 3-6)
- Wei S., Chen Z., Lu C.B., Ma J., Bai W.B., and Wu X.Y., 2012, Multiplex PCR detection of transgenic components of genetically modified rice, *Shipin Kexue (Food Science)*, 33(12): 159-162 (魏霜, 陈贞, 芦春斌, 马骏, 白卫滨, 吴希阳, 2012, 多重 PCR 检测转基因水稻的转基因成分, *食品科学*, 33(12): 159-162)
- Wu H.B., Sun H.W., Li B.D., Yang C.L., and Lu X.B., 2009, Detection of genetically modified maize by multiplex PCR-gene chip, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 17(6): 1075-1082 (武海斌, 孙红炜, 李宝笃, 杨崇良, 路兴波, 2009, 转基因玉米多重 PCR-基因芯片联用的检测方法, *农业生物技术学报*, 17(6): 1075-1082)
- Wu Y., Lu X.Z., Zhao W., Wang X.F., and Li L., 2006, Analysis method of genetically modified detection of multiplex polymerase chain reaction (MPCR), *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 34(7): 1297-1299 (吴影, 陆徐忠, 赵伟, 汪秀峰, 李莉, 2006, 多重 PCR 分析方法应用于转基因农作物的检测, *安徽农业科学*, 34(7): 1297-1299)
- Yang Z., Chen H., Tang W., Hua H.X., and Lin Y.J., 2011, Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes, *Pest Manag. Sci.*, 67(4): 414-422
<http://dx.doi.org/10.1002/ps.2079>
- Ye G.Y., Shu Q.Y., Yao H.W., Cui H.R., Cheng X.Y., Hu C., Xia Y.W., Gao M.W., and Altosaa I., 2001b, Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* berliner to two stem borers, *Journal of Economic Entomology*, 94(1): 271-276
<http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493-94.1.271>
PMid:11233125
- Ye G.Y., Tu J.M., Hu C., Datta K., and Datta S.K., 2001a, Transgenic IR72 with fused Bt gene *cryIAb/cryIAc* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species under field conditions, *Plant Biotechnology*, 18(2): 125-133
<http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.125>
- Zhang H.C., Wang X.F., Li Y.Y., Chen X.Y., Liao Q.M., and Xu J.F., 2012, A rapid and accurate PCR method for homozygous lines screening for genetically modified rice containing *CryIAb*, *Zhejiang Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Zhejiangensis)*, 24(4): 549-553 (张焕春, 汪小福, 李玥莹, 陈笑芸, 缪青梅, 徐俊锋, 2012, 转 *CryIAb* 水稻纯合体快速准确的 PCR 鉴定方法, *浙江农业学报*, 24(4): 549-553)
- Zheng X.S., Yang Y.J., Xu H.X., Chen H., Wang B.J., Lin Y.J., and Lu Z.X., 2011, Resistance performances of transgenic Bt rice lines T_{2A}-1 and T1c-19 against *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Journal of Economic Entomology*, 104(5): 1730-1735
<http://dx.doi.org/10.1603/EC10389>
PMid:22066204